马铃薯甲虫 *N*-β-丙酰多巴胺水解酶基因的克隆及功能分析

杜晓燕[1,2], 付开赟[2,*], 徐晴玉[3], 吐尔逊·阿合买提[2], 丁新华[2], 何 江[2], 郭文超[4,*]

(1. 塔里木大学植物科学学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 新疆农业科学院植物保护研究所, 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室, 乌鲁木齐 830091; 3. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 4. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要:【目的】通过 RNAi 技术分析明确对马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 黑色素形成重要的 *N*-β-丙酰多巴胺(NBAD)水解酶基因的功能。【方法】NBAD 水解酶基因通过马铃薯甲虫转录组数据分析和 RT-PCR 克隆获得,分别利用序列比对和系统发育分析确定该基因的完整性和系统发育;通过 qPCR 检测其在马铃薯甲虫各发育阶段和 4 龄幼虫不同组织及成虫精巢和卵巢中的表达量;采用喂食幼虫 dsRNA 的方法,观察该基因在马铃薯甲虫幼虫的生长发育过程中对体色的影响,并测定保幼激素和蜕皮激素对该基因表达的影响。【结果】克隆得到马铃薯甲虫 NBAD 水解酶基因,命名为 *Ldtan*(GenBank 登录号: KY221866),其编码蛋白的氨基酸序列与鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 同源蛋白的氨基酸序列的一致性最高,聚为一支。*Ldtan* 在马铃薯甲虫 4 龄幼虫腹神经索(99.36 ± 0.95)、后肠(17.79 ± 3.11)和表皮(9.21 ± 0.12)中的相对表达量较高;在幼虫期随幼虫生长发育表达量逐渐升高,在成虫期的表达量最高。通过喂食 2 龄幼虫 *Ldtan* 的 dsRNA 能有效降低靶标基因的表达量,使幼虫体色变深呈一定的棕褐色,并且具有一定的致死效应。通过 RNAi 技术干涉保幼激素合成和信号途径相关基因,发现 *Ldtan* 表达量降低,而干扰蜕皮激素合成和信号途径相关基因,*Ldtan* 表达量增加。【结论】结果提示 Ldtan 参与了马铃薯甲虫的黑色素合成,并且蜕皮激素和保幼激素可能影响其表达。

关键词: 马铃薯甲虫; RNA 干扰; NBAD 水解酶; 保幼激素; 蜕皮激素

中图分类号: S435.32 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2018)06-0637-09

Molecular cloning and functional characterization of *N*-β-alanyl-dopamine hydroxylase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae)

DU Xiao-Yan[1,2], FU Kai-Yun[2,*], XU Qing-Yu[3], Tursun AHMAT[2], DING Xin-Hua[2], HE Jiang[2], GUO Wen-Chao[4,*] (1. College of Plant Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China; 2. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crop in Northwestern Oasis, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. Institute of Microorganism Application, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31760544); 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室开放基金资助课题计划(KFJJ2016010); 新疆农业科学院条件平台建设项目(重点实验室)(xjnkkl-2016-007); 自治区公益性科研院所基本科研业务经费(KYGY2016120); 广东省科技厅公益研究与能力建设专项(2014A020209067); 新疆维吾尔自治区"百名青年博士引进计划"

作者简介: 杜晓燕, 女, 1993 年 10 月出生, 新疆喀什人, 硕士研究生, 研究方向为入侵害虫综合防治技术, E-mail: 1053344393@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: gwc1966@163.com; fukaiyun000@foxmail.com

收稿日期 Received: 2017-11-01; 接受日期 Accepted: 2018-01-10

Abstract:【Aim】This study aims to clarify the function of *N*-β-alanyl-dopamine (NBAD) hydrolase gene important in melanin biosythesis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference.【Methods】The NBAD hydrolase gene in *L. decemlineata* was characterized by data mining based on its transcriptome, its cDNA was cloned by RT-PCR, and the gene completeness and phylogeny were determined by multiple alignment and phylogenetic analysis, respectively. The expression levels of NBAD hydrolase gene in different developmental stages, tissues of the 4th instar larvae and male gonad and ovary of adults of *L. decemlineata* were detected by qPCR. The color change during larval growth was observed after RNAi, and the mechanism how the expression of NBAD hydrolase gene was influenced by juvenile hormone (JH) and molting hormone (MH) was assayed .【Results】An NBAD hydroxylase gene was cloned from *L. decemlineata* and named *Ldtan* (GenBank accession no.: KY221866). Its encoded protein shows the highest amino acid sequence identity with the homologous proteins from *Tribolium castaneum* and *Dendroctonus ponderosae* and clustered into the same clade with them. The spatial expression profiles showed that *Ldtan* were highly expressed in ventral nerve cord, hindgut and cuticle of *L. decemlineata*, with the relative expression levels of 99.36 ± 0.95, 17.79 ± 3.11 and 9.21 ± 0.12, respectively, while the temporal expression profiles showed that its expression level increased along with larval growth and reached the peak at the adult stage. Knockdown of *Ldtan* gene by feeding ds*Ldtan* to the 2nd instar larvae not only led to tanned color, but also a degree of lethal effect. Knocking down the expression of JH synthesis and signal-related genes by RNAi downregulated the expression of *Ldtan*, while knocking down the expression of MH synthesis and signal-related genes by RNAi upregulated the expression of *Ldtan*.【Conclusion】The results suggest that Ldtan is involved in melanin synthesis in *L. decemlineata*, and JH and MH probably regulate its expression.

Key words: *Leptinotarsa decemlineata*; RNA interference; NBAD hydrolase; juvenile hormone; molting hormone

昆虫的黑化反应是昆虫黑色素合成和代谢过程中参与调节防御免疫、表皮的体色形成和骨化硬化的一系列生理生化反应(江幸福和罗礼智, 2007)。在昆虫的表皮中,黑色素的合成主要通过多巴、多巴胺、N-乙酰多巴胺(N-acetyl-dopamine, NADA)和 *N*-β-丙酰多巴胺(*N*-β-alanyl-dopamine, NBAD)等色素前体物质,通过酚氧化酶形成相应的醌,进一步和表皮中的蛋白质或几丁质形成无色、黄色、红褐色乃至黑色的外骨骼,起到防御免疫、支撑虫体和保持水分等重要作用(朱福兴等, 2007)。目前在马铃薯甲虫的 RNA 干扰(RNAi)研究中尚缺乏易于观察的对照处理方法,这为及时辨别 RNAi 操作过程是否有效带来一定技术难度。此外,先前在赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中的研究表明鞘翅目中黑色素途径的基因功能和鳞翅目、双翅目、膜翅目和半翅目中也具有较大的差别(Ito *et al*., 2010; Buttstedt *et al*., 2014; 王博等, 2015; 于红松, 2015; Spaethe *et al*., 2016)。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,黑色素合成途径的基因功能在昆虫中最为明晰,如 NBAD 合成酶基因(*ebony*)或 DCE(dopachrome conversion enzyme family)基因(*yellow*)的基因缺失品系由于具有明显的可观察表型早已被用于对照组;在家蚕 *Bombyx mori* 的研究中,酪氨酸羟化酶基因(*TH*)的第一内含子中一个增强子元件突变导致家蚕的体色浅于野生型家蚕(Noh *et al*., 2015);在赤拟谷盗中,对 DCE 家族基因的功能研究发现 *yellow-e* 在保持虫体水分起到重要的作用,而赤拟谷盗的 *yellow-y* 的表达降低并没有如黑腹果蝇中体色变黄,但会使翅痣颜色变浅(Noh *et al*., 2015)。

此外,前人的研究也表明保幼激素 JH 和蜕皮激素 MH 可能参与黑色素合成途径的调控,如在燕尾蝶 *Papilio xuthus* 中,20E 可以促进黄体基因 *yellow-y* 的表达从而促进其体色变浅(Futahashi *et al*., 2007),而在德国小蠊 *Blattella germanica* 的研究中,JH 是促进其体色加深的关键因子(Das and Gupta, 1977)。然而目前在鞘翅目等其他昆虫中激素调节黑色素合成的报道仍旧较少。

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle),属鞘翅目(Coleoptera)叶甲科(Chrysomelidae)负泥虫亚科(Criocerinae),是世界

性马铃薯上最具毁灭性的害虫，也是我国对外重大检疫对象和重要外来入侵物种之一（郭文超，2013）。目前有关体色合成基因的研究主要集中在果蝇与家蚕上，而马铃薯甲虫具有明显的黄、红和黑的体色特征可为研究该途径基因功能提供较多便利；此外，在前人对马铃薯甲虫的研究发现，喂食大肠杆菌 *Escherichia coli* 原核表达的 dsRNA 能简便、有效地降低马铃薯甲虫靶标基因的表达（Wan *et al.*, 2014；Liu *et al.*, 2014；Wan *et al.*, 2015；Shi *et al.*, 2016；Fu *et al.*, 2016），两方面的条件为研究马铃薯甲虫黑色素合成相关基因的功能提供了便利。本研究克隆并验证马铃薯甲虫的 NBAD 水解酶基因，并利用 qPCR 确定该基因的时空表达特征，分析利用 RNA 干扰技术沉默该基因对马铃薯甲虫体色特征的影响，为进一步探究该基因的功能和激素调节方式，揭示马铃薯甲虫黑色素合成途径基因的分子功能提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

马铃薯甲虫于 2016 年 5 月采自新疆农业科学院安宁渠综合试验场天敌资源繁育研究中心，饲养温度 25 ± 1℃，光周期 16L∶8D，相对湿度 75% ± 5%。幼虫用新鲜马铃薯叶片饲喂，待发育至 2 龄开始用于试验。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol 购于 Invitrogen 公司，引物合成委托南京金斯瑞，SuperScript III 反转录酶、Oligo（dT）18 随机引物、Taq DNA 聚合酶、dNTP mixture（2.5 mmol/L 和 10 mmol/L）、RNase 抑制剂、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。pGEM-T easy vector 购自 Promega 公司。DNA 凝胶回收试剂盒为 AXYGEN 和 Promega 公司产品；pEASY-T3 载体感受态细胞购自北京全式金公司；*Eco*R Ⅰ 和 T4 连接酶购自 Fermantas；其他试剂为国产 AR 级或进口产品如酵母提取液（yeast extract）和胰蛋白胨（tryptone）为 Oxiod 公司产品。

1.3　马铃薯甲虫 NBAD 水解酶基因克隆

马铃薯甲虫 NBAD 水解酶基因利用 NCBI 获取的黑腹果蝇 NBAD 水解酶基因的氨基酸序列（GenBank 登录号：AHN59513），通过 NCBI 的 tblastn 本地搜索马铃薯甲虫转录组和基因组数据获得，转录组由南京农业大学植物保护学院李国清老师惠赠，基因组由 https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods/colorado-potato-beetle-genome-project 下载获得。获得 e 值最高的序列，利用 Primer Premier 5.0 设计 End to End 引物验证序列的完整性，上游引物：5′-TGTCTGAAGGTATCGGTC-3′；下游引物：5′-TAATAAAGTAACGGTGCT-3′。

PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 模板 1 μL，dNTP 1 μL，10 × Mg^{2+} Buffer 2.5 μL，上下游引物各 1 μL，其余用 ddH_2O 补齐。PCR 反应条件：94℃ 60 s；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 2 min，循环 40 次；72℃ 10 min。反应完成后样品通过琼脂糖凝胶电泳检测，目标条带切胶回收，回收样液直接送公司测序。

1.4　生物信息学分析

由 1.3 节获得的 NBAD 水解酶基因核酸序列，通过 NCBI BlastX 搜索、挑选并下载近缘种 NBAD 序列，利用 ClustalX v2.0 进行序列比对，在 GeneDoc 中处理获得最终效果图。经过 Clustal X2.0 比对获得结果，在 MEGA v6.06 中进行系统发育分析，选择模型为邻接法，替代模型为泊松模型，自展次数 1 000 次。

1.5　马铃薯甲虫 NBAD 水解酶基因在发育过程中的时空表达

qPCR 引物利用 GenScript 在线网站设计，参数选择默认，目的基因 qPCR 引物：上游引物：5′-AATTCTTCGCGCTCAGGGAA-3′；下游引物：5′-CTTTCCGCAAGGTTTGTCCG-3′。内参基因为 *ARF*4 和 *RP*18，参照 Shi（2016）设计引物，*ARF*4 上游引物：5′-GGACCTATCTTCAGCTATGCGT-3′；下游引物：5′-CAATCCCTCGTGAAGGCCA-3′。*RP*18 上游引物：5′-ACTTCGTGTCACTGAAACTGC-3′；下游引物：5′-TATCCGCACGACTTCCTGC-3′。

马铃薯甲虫不同发育虫态，包括卵、1 – 4 龄幼虫、蛹和雌雄成虫，4 龄幼虫不同组织，包括前肠、中肠、后肠、马氏管、脂肪体、表皮、腹神经索和血淋巴，以及成虫卵巢和精巢组织利用 Trizol 提取（Invitrogen）总 RNA，每一组样品包含 3 ~ 10 的个体，每组处理具有 3 次生物学重复。反转录采用 Superscript III 反转录酶（TaKaRa）合成 cDNA。qPCR 反应体系为20 μL：RNA 使用 1 μg，qPCR Mix Buffer 10 μL，qPCR 上下游引物各 0.8 μL，ROX Reference Dye Ⅰ 0.4 μL，剩余 ddH_2O 补齐。qPCR 的反应步骤参考 ABI 7300 默认反应程序：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 31 s，共 40 个循环。

1.6 马铃薯甲虫 NBAD 水解酶基因功能的 RNAi 分析

1.6.1 dsRNA 原核表达系统的构建：本实验用大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115(DE3) RNase Ⅲ 缺失品系和南京农业大学惠赠的 pET-2p dsRNA 表达载体。载体构建方法参照，Fu 等 (2014)，用于构建 *tan*，*HR*3［蜕皮激素受体基因 3(hormone receptor 3 gene)，参与蜕皮激素信号转导］，*EcR*［蜕皮激素受体基因(ecdysone receptor gene)，参与细胞中蜕皮激素的结合和信号转导］，*AS-c*［咽侧体静止激素 c 基因(allatostatin-c gene)，参与调节保幼激素合成］，*JHAMT*［保幼激素甲基转移酶基因(juvenile hormone acid methyl transferase gene)，参与保幼激素的合成］，*phm* (306a1 基因)和 *shd* (细胞色素 314a1 和 Cyp314a1 基因，参与 20-羟蜕皮酮的合成)的 dsRNA 的 cDNA 片段根据已有报道(Guo *et al*., 2015; Shi *et al*., 2016)，*egfp* 为对照，PCR 克隆获得，引物见表 1。以 1.3 节中获得的各个组织的混合模板 cDNA 1.0 μL，参照 TaKaRa 公司 rTaq 反应体系以 25 μL 反应体系进行克隆，PCR 反应条件：94℃ 3 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 35 次；72℃ 10 min。反应获得的片段连入全式金公司 pEasy-T3 载体，最终挑取获得的阳性克隆送南京金斯瑞测序，测序获得的结果通过 GeneDoc 比对序列的正确性。验证的片段通过菌液扩大培养并提取含有片段的 Transit-T1 载体，通过 *Eco*R Ⅰ 酶切产生粘性末端，目标片段通过琼脂糖凝胶电泳分离后通过胶回收纯化，利用 T4 连接酶连入已通过 *Eco*R Ⅰ 产生粘性末端的 pET-2p 载体，连接完成的载体转入 HT115 (DE3)细胞中在含有卡那霉素(50 μg/mL)和四环素(12.5 μg/mL)的固体培养基筛选阳性克隆。获得的阳性克隆通过测序和异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG) 诱导发酵 dsRNA 验证结果。诱导发酵的步骤参照吕东摸索的条件(吕东, 2010)，在菌液重新扩大培养至 OD_{600} = 1.0 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L，发酵表达 dsRNA 6 h 即可获得稳定表达的浓度约为 0.05 μg/μL 的 dsRNA(Fu *et al*., 2014)。以上所用试剂盒均按照其说明书的标准化程序进行。

表 1 用于构建 dsRNA 原核表达载体的引物

Table 1 Primers used for dsRNA synthesis

引物 Primers	上游引物(5′-3′) Forward primer	下游引物(5′-3′) Reverse primer
dstan	CGGGATGTAGGATGTGGA	TGTTGGTACGGTCGCTGA
dsshd	CTCTTCCTCGGTTATTCTTGCC	ATGCAAACCAGTTCAGGCC
dsEcR	GATCTATCCCCTCCCAGCAG	TCGTTCCGTTTGACAGCG
dsphm	TATGGGCTCAGTCTGGGAAAT	CCCCAAACTGTGCCGAAG
dsHR3	GTGGAATAATGTAACGACCAAG	GAAGACGGCAGTACTGGC
dsAS-c	GGCATCTGGGAGAAAATAG	GAAGTAGCAGGCTCTGAATCT
dsJHAMT	ACATCGCCCCATTCCACG	TCCTACAGTTTCTGGTTTGGTG
dsegfp	AAGTTCAGCGTGTCCG	CTTGCCGTAGTTCCAC

1.6.2 RNAi：将已构建好的 pET-2p-*tan*，pET-2p-*egfp*，pET-2p-*HR*3，pET-2p-*EcR*，pET-2p-*AS-c*，pET-2p-*JHAMT*，pET-2p-*shd* 和 pET-2p-*phm* 大肠杆菌表达载体，在含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中以体积比 1∶100 的比例扩大培养，于 37℃ 220 r/min 条件下震荡培养 3.5 h，即 OD_{600} = 1.0 时，按 1∶1 000 比例(v/v)添加已经配好的 IPTG 母液(母液浓度为 0.0238 g/mL)，至终浓度为 0.1 mmol/L，继续恒温震荡 4～5 h，以此过程获得新鲜 dsRNA。

选取发育条件一致的 2 龄初幼虫，分别设置超纯水与表达 ds*egfp* 菌液为空白对照和阴性对照，每个处理 40 头，其中 10 头用于收样，每个处理 3 组生物学重复，总计处理约 1 080 头幼虫。将马铃薯叶片置于各处理的新鲜菌液中，将表达完成的菌液用 ddH_2O 稀释 10 倍均匀涂抹于马铃薯叶片，待风干后接入马铃薯甲虫，每 24 h 更换一次处理过的叶片，干扰 3 d 后更换新鲜叶片。每天观察体表变化特征并记录试虫死亡率，直至马铃薯甲虫出现化蛹迹象，将其转移至土壤深度为 5～12 cm 的人工化蛹场地内，观察其最终的死亡率、化蛹率及成虫羽化率。

1.7 统计分析

所有数据均给出均值 ± 标准误，体色通过 Adobe Photoshop CS5 的拾色器功能获得 RGB 值，qPCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对表达量，发育阶段和组织表达数据通过 ANOVA 的 Tukey-Kramer 分析进行统计检验，显著性水平选 $P < 0.05$；RGB 值、存活率、化蛹率和羽化率、RNA 干扰的 qPCR 数据利用 Stutent's *t* 检验，显著性水平选 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$。

2　结果

2.1　马铃薯甲虫 NBAD 水解酶的多序列比对及进化分析

根据马铃薯甲虫转录组数据分析得到的体色相关基因片段，设计特异性引物扩增克隆并获得了马铃薯甲虫 tan 基因全长 cDNA，命名为 *Ldtan*（GenBank 登录号：KY221866），ORF 包含 1 399 bp，编码 438 个氨基酸。通过 NCBI 在线 BLAST 将 *Ldtan* 翻译的氨基酸序列进行相似性搜索比对，将 5 种昆虫的氨基酸序列比对后（图 1：A）发现，尽管不同昆虫 tan 序列均具有一定的差异，但所有的昆虫 tan 蛋白均有乙酰辅酶 A：6-氨基青霉烷酸脂肪酰转移酶结构域的 NBAD 水解酶家族特征。利用 NJ 系统发育构树方法发现，马铃薯甲虫与鞘翅目的赤拟谷盗和山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 亲缘关系较近，且聚为一支；鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori* 和玉带凤蝶 *Papilio polytes* 聚为一支，自展一致度为 100%；双翅目的致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 和白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 聚在同一进化分支上，且自展一致度为 100%；其他各目昆虫各自聚成小类群（图 1：B），表明 *Ldtan* 基因在进化过程中具有较好的保守性。

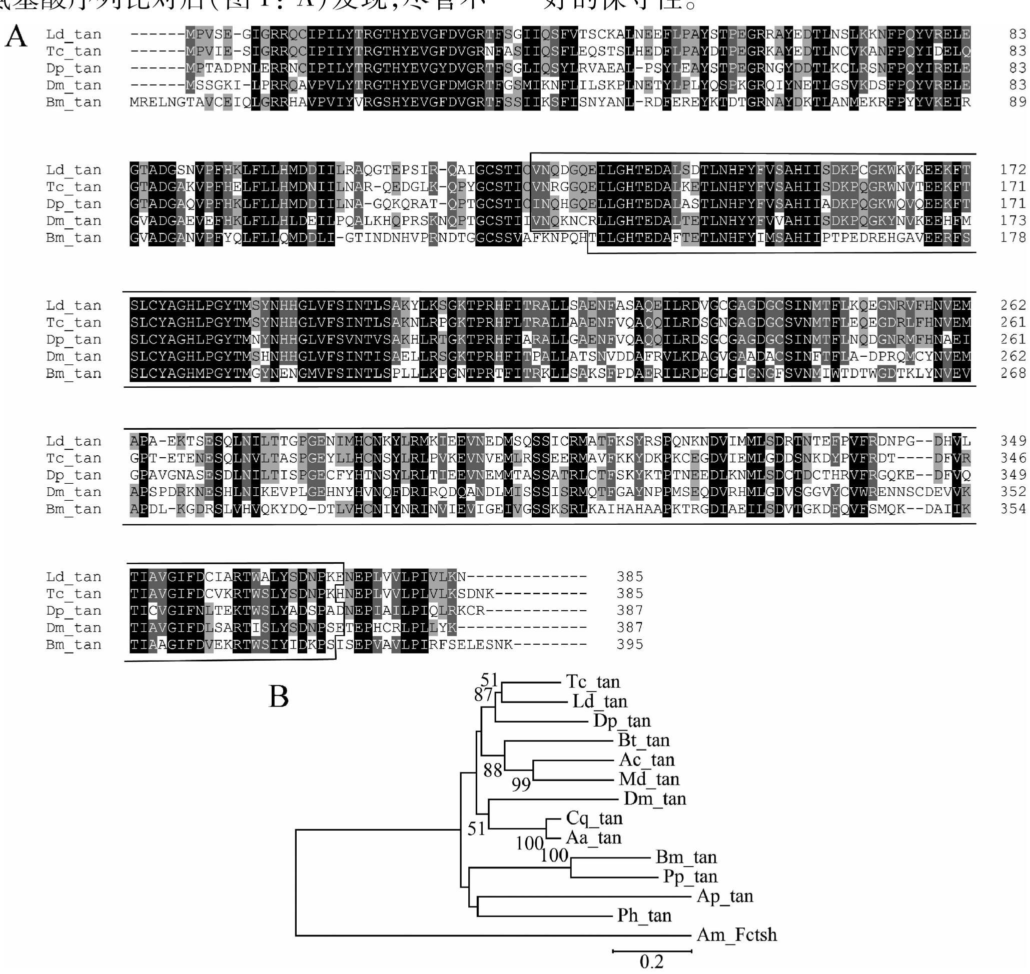


图 1　昆虫 tan 蛋白的氨基酸序列比对（A）和系统发育（B）

Fig. 1　Multiple alignment of amino acid sequence (A) and the phylogeny (B) of tan proteins in insects

昆虫 tan 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of tan proteins and their GenBank accession numbers：Ld_tan：马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（KY221866）；Dm_tan：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（ADH82102.1）；Bm_tan：家蚕 *Bombyx mori*（NP_001170882.1）；Pp_tan：玉带凤蝶 *Papilio polytes*（XP_013133546.1）；Dp_tan：山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*（XP_019761881.1）；Tc_tan：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（XP_971848.1）；Am_Fctsh：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（XP_006568689.1）；Bt_tan：地熊蜂 *Bombus terrestris*（XP_003396281.1）. Ac_tan：东方蜜蜂 *Apis cerana*（XP_016912338）；Md_tan：毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor*；Cq_tan：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（XP_001848733）；Aa_tan：白纹伊蚊 *Aedes albopictus*（XP_001655262）；Ph_tan：体虱 *Pediculus humanus*（XP_002430807）；Ap_tan：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（XP_008180780）. 灰色框表示乙酰辅酶 A：6-氨基青霉烷酸脂肪酰转移酶结构域，黑色、灰色、白色阴影分别表示氨基酸序列的一致性 100%，80% 和 80% 以下。使用 Maga6.06 对系统发育树氨基酸全长序列进行分析，构建 Bootstrap 方法分析，每个分支进行1 000次验证，标尺示遗传距离。Grey box shows acyl-coenzyme A：6-aminopenicillanic acid acyl-transferase domain. Black, gray, and white shadows indicate that the amino acid sequence identities are 100%, 80%, and below 80%, respectively. Maga6.06 was used to analyze the amino acid sequence of phylogenetic tree. Numbers on each node are bootstrap values of 1 000 replicates, and the scale bar indicates the genetic distance.

2.2 马铃薯甲虫发育过程中 *Ldtan* 的时空表达

通过 qPCR 分析发现，在马铃薯甲虫不同发育阶段的表达模式表明，*Ldtan* 在卵(数据未展示在图中)、1 龄幼虫期表达量相对较低，随后在 3 龄和 4 龄幼虫期表达量逐渐增高，在蛹期和成虫期达到表达量高峰，表明 *Ldtan* 的表达随幼虫的生长发育逐渐升高，后又在 4 龄中期逐渐下降，在蛹和成虫期表达量最高(图 2：A)。在马铃薯甲虫 4 龄幼虫不同组织的表达模式表明，*Ldtan* 表达量在腹神经索、后肠、表皮中表达量相对较高，分别为 99.36 ± 0.95, 17.79 ± 3.11, 9.21 ± 0.12。在前胸腺、中肠、马氏管、脑、前肠、卵巢、脂肪体、血淋巴、精巢中表达量较低，分别为 4.88 ± 1.06, 5.23 ± 0.41, 5.23 ± 0.21, 2.22 ± 1.03, 3.02 ± 0.86, 3.60 ± 0.09, 1.89 ± 0.51, 0.67 ± 0.20 和 1.00 ± 0.17，雌雄虫生殖腺中均有表达，且在雌虫中表达量较雄虫相对高(图 2：B)。

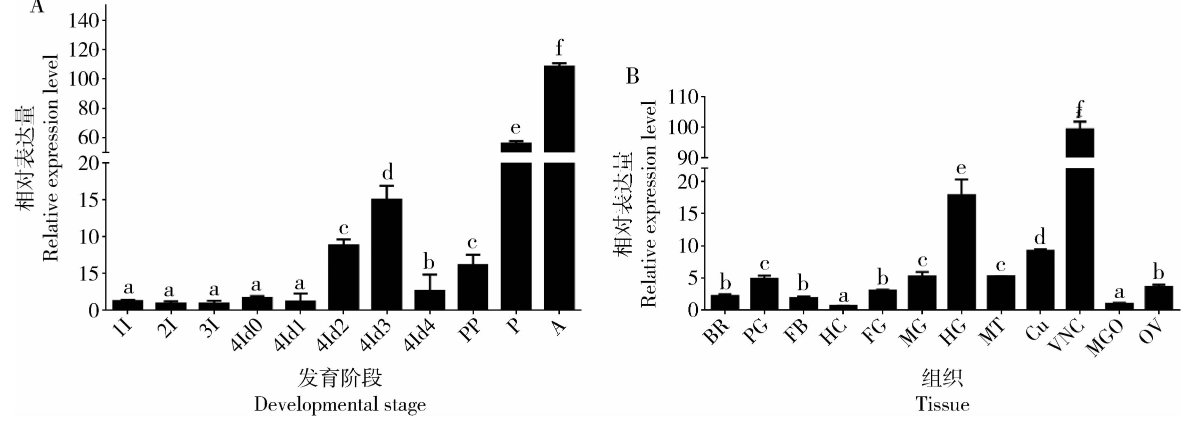


图 2 *Ldtan* 在马铃薯甲虫不同发育阶段(A)和 4 龄幼虫不同组织及成虫精巢和卵巢中(B)的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *Ldtan* in different developmental stages (A), tissues of the 4th instar larvae and male gonad and ovary of adults (B) of *Leptinotarsa decemlineata*

1I－3I：分别是 1－3 龄幼虫 1st－3rd instar larva, respectively; 4Id0, 4Id1, 4Id2, 4Id3, 4Id4：分别为 0－4 d 的 4 龄幼虫 Day-0－4 4th instar larva, respectively; PP：预蛹期 Prepupal stage; P：蛹期 Pupal stage; A：成虫期 Adult stage. BR：脑 Brain; PG：前胸腺 Prothoracic glands; FB：脂肪体 Fat body; HC：血淋巴 Haemolymph; FG：前肠 Foregut; MG：中肠 Midgut; HG：后肠 Hindgut; MT：马氏管 Malpighian tubules; Cu：表皮 Cuticle; VNC：腹神经索 Ventral nerve cord; MGO：精巢 Male gonad; OV：卵巢 Ovary. 图中柱表示平均值 ± 标准误。通过 ANOVA 的 Tukey-Kramer 分析，柱上不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。The bars represent mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level by ANOVA's Tukey-Kramer analysis.

2.3 ds*tan* 对马铃薯甲虫幼虫的影响

通过喂食马铃薯甲虫 2 龄幼虫原核表达的 310 bp长度的 ds*tan*，能显著降低靶标基因的表达量($P<0.01$)(图 3：D)。相较空白对照组和 ds*egfp* 处理组(阴性对照)，喂食幼虫 ds*tan* 能显著降低幼虫 *Ldtan* 的表达量。此外，ds*tan* 处理能在幼虫的整个发育过程中显著降低其存活率(图 3：A)，相较对照组和 ds*egfp* 处理组分别降低 25.0% 和 28.1%($P<0.05$)，而并不能显著影响化蛹率(图 3：B)和成虫羽化率(图 3：C)($P>0.05$)。通过与空白对照组和 ds*egfp* 处理组分析体色差异，ds*tan* 处理组在 2 龄幼虫发育至 4 龄中末期时幼虫体色呈现深棕褐色(图 4：C 相较 A 和 B 图颜色均加深)，通过 Photoshop 的拾色器功能发现 RGB 中的 R 值具有显著性差异($P<0.05$)(图 4：D)。

2.4 干扰保幼激素和蜕皮激素合成和信号传导基因对 *Ldtan* 表达的影响

本研究进一步通过 RNAi 分别降低马铃薯甲虫保幼激素合成基因 *LdJHAMT*、保幼激素静止激素基因 *LdAS-c*、蜕皮激素合成相关 P450 基因 *Ldphm* 和 *Ldshd*、蜕皮激素受体基因 *LdEcR* 和其信号转导基因 *LdHR3* 后(图 5：A, $P<0.05$)，检测了干涉这些基因对 *Ldtan* 表达的影响。结果发现通过 RNA 干扰 *Ldphm* 和 *Ldshd* 而降低蜕皮激素滴度(Kong *et al*., 2014)或降低蜕皮激素信号受体基因 *LdEcR* 的表达均会增加 *Ldtan* 的表达(图 5：B, ds*phm*：2.523 ± 0.153, $P<0.01$; ds*shd*：16.001 ± 1.407, $P<0.01$; ds*EcR*：2.317 ± 0.062, $P<0.01$)，通过降低 *LdHR3* 的表达从而增加蜕皮激素滴度反而会降低 *Ldtan* 的表达(ds*HR3*：0.592 ± 0.052, $P<0.05$)；通过降低 *JHAMT* 的表达从而降低保幼激素滴度会显著降低 *Ldtan* 的表达(ds*JHAMT*：0.193 ± 0.013, $P<0.01$)，降低保幼激素静止激素基因 *LdAS-c* 的表达从而提高保幼激素滴度会显著增加 *Ldtan* 的表达(92.927 ± 8.252, $P<0.01$)。以上结果表明 *Ldtan* 可能受蜕皮激素的负向调控和保幼激素的正向调控。

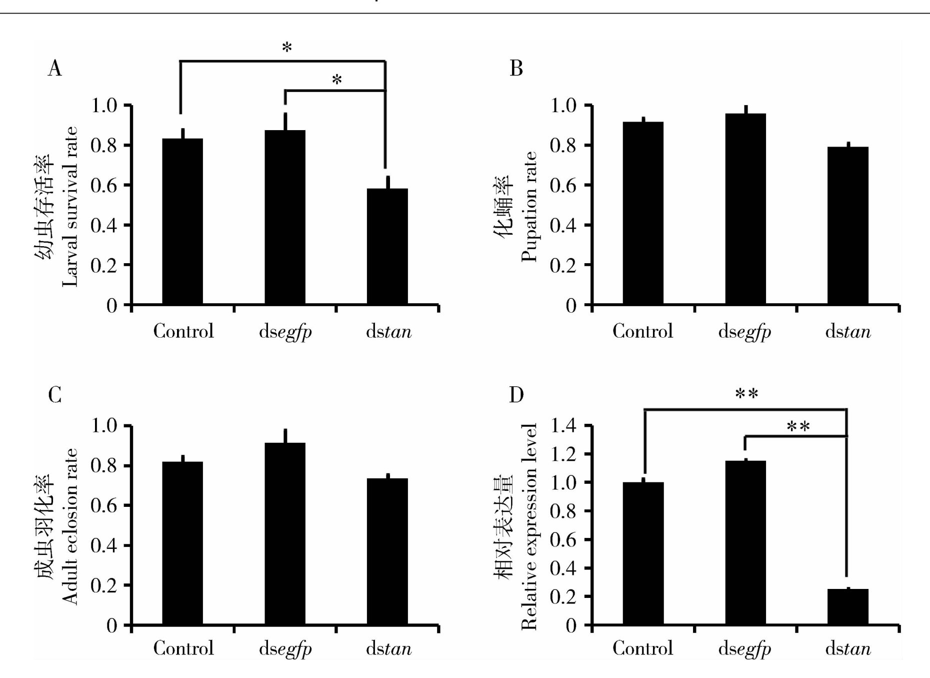


图 3　RNA 干扰 *tan* 对马铃薯甲虫幼虫存活率(A)、化蛹率(B)、成虫羽化率(C)及 *Ldtan* 相对表达水平(D)的影响

Fig. 3　Effects of RNAi of *tan* on larval survival rate (A), pupation rate (B), adult eclosion rate (C) and relative expression level of *Ldtan* (D) in *Leptinotarsa decemlineata*

2 龄幼虫分别喂食 ddH_2O, ds*egfp* 和 ds*tan*,分别作为空白对照组、阴性对照组和处理组。通过 Student's *t* 检验分析,单星号和双星号分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。The 2nd instar larvae were fed with ddH_2O, ds*egfp* and ds*tan*, and used as the blank control group, negative control group and treatment group, respectively. Single asterisk and double asterisk indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 level, respectively, by Student's *t* test.

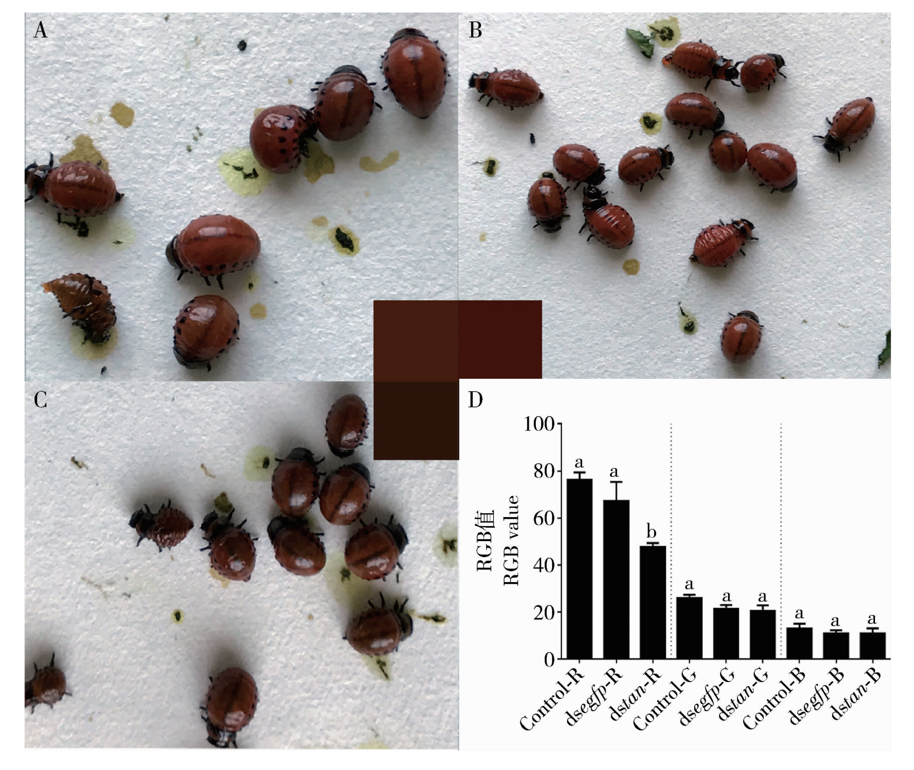


图 4　RNA 干扰 *tan* 后马铃薯甲虫幼虫体色的改变

Fig. 4　Body color change of *Leptinotarsa decemlineata* larvae after RNAi of *tan*

用 ddH_2O(A), ds*egfp* (B)和 ds*tan* (C)分别饲喂 2 龄幼虫,利用 Photoshop 的拾色器功能获得体色的 RGB 值(D),经统计分析后将均值所获得的颜色展示于图片的角落。通过 Student's *t* 检验分析,柱上不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。The 2nd instar larvae were fed with ddH_2O (A), ds*egfp* (B) and ds*tan* (C), respectively. The RGB value of larval body color (D) was obtained by using Color Picker in Photoshop, and the color of the mean RGB value in each treatment is shown in the corner of each picture. Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level by Student's *t* test.

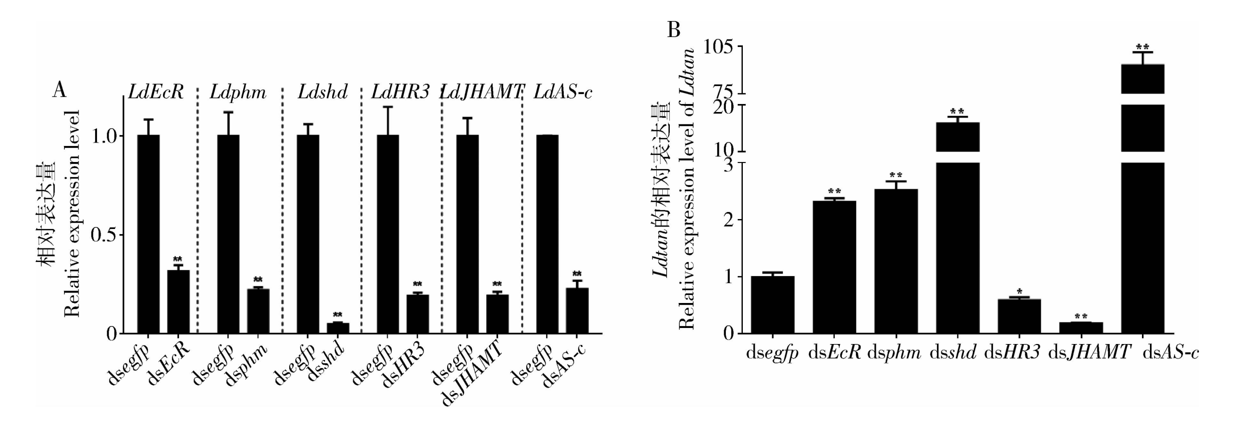


图 5 RNA 干扰马铃薯甲虫保幼激素和蜕皮激素合成和信号途径相关基因后对 *Ldtan* 表达的影响

Fig. 5 Effect of knocking down the expression of JH and MH biosynthesis and signal-related genes of *Leptinotarsa decemlineata* by RNAi on the expression of *Ldtan*

A：RNAi 对蜕皮激素相关基因 *LdEcR*，*Ldphm*，*Ldshd* 和 *LdHR*3 及保幼激素相关基因 *LdJHAMT* 和 *LdAS-c* 表达的影响 Effect of RNAi on the expression of molting hormone related genes（*LdEcR*，*Ldphm*，*Ldshd* and *LdHR*3）and juvenile hormone related genes（*LdJHAMT* and *LdAS-c*）；B：通过 RNAi 降低 *LdEcR*，*Ldphm*，*Ldshd*，*LdHR*3，*LdJHAMT* 和 *LdAS-c* 的表达对 *Ldtan* 表达的影响 Effect of knocking down the expression of *LdEcR*，*Ldphm*，*Ldshd*，*LdHR*3，*LdJHAMT* and *LdAS-c* by RNAi on the expression of *Ldtan*. ds*egfp* 为对照 ds*egfp* was used as the control. 通过 Student's *t* 检验分析，柱上单星号和双星号分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。Single asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 level，respectively，by Student's *t* test.

3 讨论

黑色素合成代谢途径不仅可以影响昆虫的体色，其通过多巴和多巴胺等神经递质的合成代谢也可以调节神经中枢的递质合成。如在黑腹果蝇中，Dmtan 在头、眼、后肠和马氏管中具有较高表达（Gramates *et al*.，2017），而本研究通过序列相似性搜索获得马铃薯甲虫的 NBAD 水解酶基因 *Ldtan* 也具有相似的表达方式：其在腹神经索、后肠和表皮中表达水平较高。此外，本研究通过喂食 2 龄幼虫原核表达的 dsRNA，发现喂食 ds*tan* 只能一定程度降低幼虫体色 R 值，且能够影响幼虫的化蛹和羽化，而在蛹期和成虫期完全不能影响体色。这与当前的许多研究结果表明，昆虫的 RNAi 具有一定的致死和致畸率，同时体色相关基因的调控也参与昆虫鞣化现象，调控昆虫表皮的黑化和硬化，起着防御和免疫的作用，这与前人研究的结果基本吻合（Ito *et al*.，2010）。而在赤拟谷盗的研究中也发现通过敲低 *yellow-y* 的表达并不能影响成虫的体色（Noh *et al*.，2015），这些结果表明黑色素途径影响体色的方式在鞘翅目和双翅目昆虫中具有较大的差别。

此外，本研究进一步分析了保幼激素和蜕皮激素对 *Ldtan* 的调节方式。发育阶段表达结果表明，*Ldtan* 在 4 龄幼虫中期、蛹期和成虫期表达量较高，进入预蛹期时下降；组织表达结果表明，*Ldtan* 在成虫的卵巢中表达较高，这些结果表明 *Ldtan* 可能受到 JH 的正向调控，MH 的负向调控。此外考虑先前有研究表明保幼激素和蜕皮激素可能参与黑色素合成相关的过程，本研究进一步设计了 RNA 干扰片段分别调控保幼激素和蜕皮激素的上调和下调过程，发现保幼激素对 *Ldtan* 具有正向调控作用，蜕皮激素对其有负向调控作用，这与发育阶段表达和组织表达结果一致。而在目前仅能获得的少数的激素对黑色素合成调节的文章可以发现，保幼激素往往可以促进体色变黑相关基因的表达加强（Das and Gupta，1977），而蜕皮激素相反（Futahashi and Fujiwara，2007），这均与本研究发现的结果基本一致。

本研究的结果为首次报道影响马铃薯甲虫体色的基因，为进一步研究鞘翅目和昆虫中黑色素合成代谢途径，保幼激素和蜕皮激素调节体色变化的机制过程提供一定的理论基础，同时为 RNAi 技术在昆虫学研究领域应用上的广泛性提供一定的参考。

参考文献（References）

Buttstedt A，Moritz RFA，Erler S，2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee（*Apis mellifera*）as members of the *yellow* gene family. *Biol. Rev*.，89(2)：255－269.

Das YT，Gupta AP，1977. Nature and precursors of juvenile hormone-induced excessive cuticular melanisation in German cockroach. *Nature*，268(5616)：139－140.

Fu KY, Guo WC, Lv FG, Liu XP, Li GQ, 2014. Response of the vacuolar ATPase subunit E to RNA interference and four chemical pesticides in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 114(1): 16－23.

Fu KY, Zhu TT, Guo WC, Ahmat T, Li GQ, 2016. Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence. *Gene*, 581(2): 170－177.

Futahashi R, Fujiwara H, 2007. Regulation of 20-hydroxyecdysone on the larval pigmentation and the expression of melanin synthesis enzymes and *yellow* gene of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(8): 855－864.

Gramates LS, Marygold SJ, Santos GD, Urbano JM, Antonazzo G, Matthews BB, Rey AJ, Tabone CJ, Crosby MA, Emmert DB, 2017. FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Res.*, 45: D663－D671.

Guo WC, 2013. The Biology, Ecology and Integrated Control of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Science Press, Beijing. ［郭文超，2013. 重大外来入侵害虫马铃薯甲虫生物学、生态学与综合防控. 北京：科学出版社］

Guo WC, Liu XP, Fu KY, Shi JF, Lü FG, Li GQ, 2015. Functions of nuclear receptor HR3 during larval-pupal molting in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) revealed by *in vivo* RNA interference. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 63: 23－33.

Ito K, Katsuma S, Yamamoto K, Kadonookuda K, Mita K, Shimada T, 2010. Yellow-e determines the color pattern of larval head and tail spots of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 285(8): 5624－5629.

Jiang XF, Luo LZ, 2007. Melanism in insects: a review. *Acta Entomol. Sin.*, 50(11): 1173－1180.［江幸福，罗礼智，2007. 昆虫黑化现象. 昆虫学报，50(11)：1173－1180］

Kong Y, Liu XP, Wan PJ, Shi XQ, Guo WC, Li GQ, 2014. The P450 enzyme Shade mediates the hydroxylation of ecdysone to 20-hydroxyecdysone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Mol. Biol.*, 23(5): 632－643.

Liu XP, Fu KY, Lü FG, Meng QW, Guo WC, Li GQ, 2014. Involvement of FTZ-F1 in the regulation of pupation in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 55: 51－60.

Lü D, 2010. Cloning and Characterization of ProdH gene cDNA from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and Bacterial Expression of dsRNA. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. ［吕东，2010. 马铃薯甲虫脯氨酸脱氢酶基因的克隆、表达分析及其 dsRNA 的发酵生产. 南京：南京农业大学硕士学位论文］

Noh MY, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Arakane Y, 2015. Loss of function of the *yellow-e* gene causes dehydration-induced mortality of adult *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.*, 399(2): 315－324.

Shi JF, Fu J, Mu LL, Guo WC, Li GQ, 2016. Two *Leptinotarsa* uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylases are specialized for chitin synthesis in larval epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 68: 1－12.

Spaethe J, Mueller MJ, Rössler W, Albert Š, 2012. Molecular and biochemical characterization of the major royal jelly protein in bumblebees suggest a non-nutritive function. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(9): 647－654.

Wan PJ, Fu KY, Lü FG, Guo WC, Li GQ, 2015. Knockdown of a putative alanine aminotransferase gene affects amino acid content and flight capacity in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Amino Acids*, 47(7): 1445－1454.

Wan PJ, Guo WY, Yang Y, Lü FG, Lu WP, Li GQ, 2014. RNAi suppression of the ryanodine receptor gene results in decreased susceptibility to chlorantraniliprole in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.*, 63(1): 48－55.

Wang B, Yao Y, Xu ZW, Lin XD, 2015. Molecular cloning and function of the *Yellow* gene from *Nilaparvata lugens*. *Sci. Agric. Sin.*, 48(15): 2976－2984.［王博，姚云，徐泽炜，林欣大，2015. 褐飞虱 *Yellow* 基因的克隆及功能. 中国农业科学，48(15)：2976－2984］

Yu HS, 2015. Molecular Evolution of Melanin Synthesis Pathway Genes in Silkworm, *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing.［于红松，2011. 家蚕黑色素合成途径基因的分子进化. 重庆：西南大学博士学位论文］

Zhu FX, Li JH, Wang M, 2007. Mechanism for insect melanism. *Chin. Bull. Entomol.*, 44(2): 302－306.［朱福兴，李建洪，王沫，2007. 昆虫的黑化机理. 昆虫知识，44(2)：302－306］

（责任编辑：马丽萍）